

木槿花生物活性物质及其抗氧化活性分析

黄采姣^{1,2}, 李安平^{1,2,*}, 李建周¹, 王晓红¹

(1.中南林业科技大学食品科学与工程学院, 湖南 长沙 410004; 2.特医食品加工湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410004)

摘 要: 研究5种木槿花及其不同极性溶剂萃取物的生物活性物质含量和抗氧化活性, 分析它们之间的相关性, 并采用高效液相色谱-串联质谱鉴定其中的活性物质成分, 以期为木槿深加工及其品种选育提供理论依据。5个品种木槿花的总酚和总黄酮含量从高到低依次为木槿原种、粉紫重瓣木槿花、薰衣草薄绸木槿花、紫玉和雅致木槿, 各品种木槿花的抗氧化活性排序与其总酚和总黄酮含量排序基本一致, 其中木槿原种的总酚和总黄酮含量最高, 分别达到了17.33 mg/g和12.68 mg/g, 且抗氧化活性最强, 其总还原能力、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)自由基清除能力、2,2'-联氮-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS)自由基清除能力分别为1.58 mmol/g和6.82、17.96 mg/g。木槿花的抗氧化活性与其总酚和总黄酮含量间有极显著的相关性($P < 0.01$), 与花青素含量相关性不显著($P > 0.05$)。木槿原种不同极性溶剂萃取物均具有一定的抗氧化活性, 其中正丁醇的总还原能力(6.16 mmol/g)最高, 且对DPPH自由基(15.50 mg/g)和ABTS自由基(40.71 mg/g)清除效果最好。从木槿原种正丁醇萃取物中初步鉴定出8种抗氧化物质, 分别为山柰酚-*O*-六碳糖-C-六碳糖苷、芹菜素、山柰酚-*O*-六碳糖-C-六碳糖苷同分异构体、芹菜素-C-二糖苷、芹菜素-葡萄糖芹糖苷、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、芹菜素-7-*O*-芸香糖苷、矢车菊素-3-丙二酰葡萄糖苷。

关键词: 木槿花; 总酚; 总黄酮; 抗氧化活性

Bioactive Components of Hibiscus Flower and Their Antioxidant Activity

HUANG Caijiao^{1,2}, LI Anping^{1,2,*}, LI Jianzhou¹, WANG Xiaohong¹

(1. College of Food Science and Engineering, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China;

2. Hunan Key Laboratory of Processed Food for Special Medical Purpose, Changsha 410004, China)

Abstract: This study aimed to investigate and correlate the bioactive components and antioxidant activity of flowers from five varieties of *Hibiscus syriacus* and different polar solvent extracts from *Hibiscus syriacus* L. for the purpose of providing a theoretical basis for deep processing and breed of hibiscus flower. The bioactive components were identified by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). The results showed that the contents of total polyphenols and total flavonoids in five varieties of *Hibiscus syriacus* were consistently in the decreasing order of *Hibiscus syriacus* L., *Hibiscus syriacus* f. *paeoniflorus*, *Hibiscus syriacus* cv. Lavandula Chiffon, *Hibiscus syriacus* cv. Shigyoku and *Hibiscus syriacus* f. *elegantissimus*. A similar order was observed in the antioxidant activity. The contents of polyphenols and total flavonoids in the flower of *Hibiscus syriacus* L. were the highest, which were 17.33 and 12.68 mg/g, respectively, and it had the strongest antioxidant activity with ferric ion reducing antioxidant power (FRAP), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging capacity, and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) radical scavenging capacity of 1.58 mmol/g, 6.82 and 17.96 mg/g, respectively. There was a significant correlation between the antioxidant activity and the contents of total polyphenols and total flavonoids ($P < 0.01$), but the correlation with anthocyanin content was not significant ($P > 0.05$). All solvent extracts from *Hibiscus syriacus* L. had antioxidant activity. The highest total reducing power (6.16 mmol/g) was observed in the *n*-butanol extract, accompanied by the strongest DPPH radical (15.50 mg/g) and ABTS radical scavenging capacity (40.71 mg/g). Eight compounds from the *n*-butanol extract were identified including kaempferol-*O*-hexose-C-glucoside, apigenin, kaempferol-*O*-

收稿日期: 2018-01-07

基金项目: 国家林业局948项目(20150417); 湖南省科技创新平台与人才计划项目(2017TP1021)

第一作者简介: 黄采姣(1992—)(ORCID: 0000-0003-4893-9466), 女, 硕士研究生, 研究方向为森林食品深加工。

E-mail: valume1992@sina.com

*通信作者简介: 李安平(1967—)(ORCID: 0000-0002-3764-7137), 男, 教授, 博士, 研究方向为森林食品深加工。

E-mail: 912336799@qq.com

hexose-C-hexose glycoside isomers, apigenin-C-diglycoside, apigenin-glycoside glucoside, behenylphenol-3-O-rutinoside, apigenin-7-O-rutinoside, and cyanidin-3-malonyl glucoside.

Keywords: hibiscus flower; total polyphenols; total flavonoids; antioxidant activity

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180107-069

中图分类号: TS201.2

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2019) 03-0042-06

引文格式:

黄采姣, 李安平, 李建周, 等. 木槿花生物活性物质及其抗氧化活性分析[J]. 食品科学, 2019, 40(3): 42-47. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180107-069. <http://www.spkx.net.cn>

HUANG Caijiao, LI Anping, LI Jianzhou, et al. Bioactive components of hibiscus flower and their antioxidant activity[J]. Food Science, 2019, 40(3): 42-47. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180107-069. <http://www.spkx.net.cn>

木槿 (*Hibiscus syriacus* Linn.) 属锦葵科木槿属落叶灌木, 又名木锦、篱障花, 因其易栽培、品种多、花色漂亮, 我国大部分地区均有种植。木槿花有清热、利湿、凉血等功能, 且色泽艳丽、肉质肥厚、口感清香、顺滑爽口、无异味, 在广东和福建等地均有食用的习俗^[1-2]。有研究表明, 木槿花具有较高的营养价值, 不仅含有丰富的蛋白质、VC、粗纤维、矿物质等, 还含有丰富的多酚类物质^[3-5]。

近年来国内外对木槿的研究主要集中在其品种选育、病虫害防治和花卉的营养成分含量等方面^[6-8], 而关于木槿花的生物活性少见文献报道。多酚和黄酮类化合物广泛存在于植物花卉中, 是一种天然抗氧化剂, 是目前的研究热点之一。张福娣等^[9]的研究表明扶桑花色素具有较强的抗氧化活性, 且其抗氧化活性随浓度的增大而增强; 李晓英等^[10]比较了蓝莓花、茎、叶酚类物质含量及抗氧化活性, 结果表明蓝莓叶和花的抗氧化物质分别主要是绿原酸和芦丁。本研究对不同品种木槿花的抗氧化活性和生物活性物质含量进行测定, 并考察其相关性, 鉴定木槿花的活性物质成分, 为木槿花的深加工和开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

紫玉 (*Hibiscus syriacus*. cv. Shigyoku)、薰衣草薄绸 (*Hibiscus syriacus*. cv. Lavandula Chiffon) 采自中南林业科技大学苗圃; 木槿原种 (*Hibiscus syriacus* L.)、雅致木槿 (*Hibiscus syriacus* f. *elegantissimus*) 采自益阳木槿基地; 粉紫重瓣木槿 (*Hibiscus syriacus* f. *paeoniflorus*) 采自长沙跳马镇木槿基地。

没食子酸、水溶性VE (Trolox)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)、芦丁、三吡啶三吡嗪 (2,4,6-tris(2-pyridyl)-S-triazine, TPTZ)、2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸) 二铵

盐 (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS) (分析纯) 美国Sigma公司; 福林-酚试剂北京鼎国昌盛生物技术有限公司; 硫酸亚铁、乙醇、正丁醇、乙酸乙酯、石油醚、三氯甲烷 (均为分析纯)、乙腈、甲酸 (均为色谱纯) 国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

QE100型高速万能粉碎机 浙江屹立工贸有限公司; YRE-5299旋转蒸发仪 巩义市予华仪器有限责任公司; UV-1800型紫外-可见分光光度计 日本岛津公司; LGJ10型真空冷冻干燥机 北京松源华兴科技发展有限公司; JY98-IIIN型超声波破碎仪 宁波新芝生物科技股份有限公司; TGL-16型医用离心机 长沙平凡仪器仪表有限公司; 高效液相色谱仪 (high performance liquid chromatography, HPLC)、G2-XSQ-TOF型质谱 (mass spectrometry, MS) 仪 美国沃特世公司。

1.3 方法

1.3.1 木槿花提取液的制备

将新鲜木槿花置于55℃干燥箱中干燥18 h, 冷却后粉碎过60目筛, 得木槿花样品。准确称取木槿花样品1.00 g, 按料液比1:36加入体积分数70%乙醇溶液混合, 避光浸泡20 min, 然后用21 kHz超声波辅助提取49 min, 离心15 min, 取上清液, 残渣按相同条件重复提取2次, 合并上清液, 用溶剂定容至250 mL, 测定各成分含量及其抗氧化活性。

1.3.2 不同溶剂萃取液的制备

称取25.00 g木槿花样品, 按1.3.1节方法制取木槿花提取液, 经旋转蒸发浓缩去除乙醇, 得粗提液。用X-5大孔树脂纯化, 向纯化液中加入等体积石油醚, 充分振荡后于分液漏斗中静置萃取, 得石油醚相和水相; 在水相中再加入等体积的三氯甲烷, 振荡摇匀后分层, 得三氯甲烷相和水相; 按相同步骤, 再在水相中依次加入乙酸乙酯和正丁醇, 分别得到乙酸乙酯相、正丁醇相和水相。每种溶剂重复萃取5次。将相同溶剂萃取相合并, 真

空浓缩,水相冷冻干燥,得到不同溶剂木槿花萃取物。各组萃取相分离流程见图1。

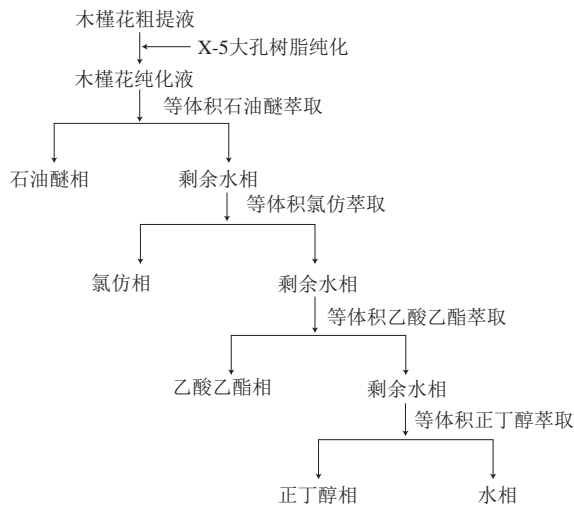


图1 木槿花各组萃取相分离流程

Fig. 1 Flow chart of sequential solvent fractionation extract from hibiscus flower

1.3.3 总酚、总黄酮、花青素含量的测定

总酚含量测定参照Marialeonoratisd等^[11]的方法并略作调整。以没食子酸为标准品(0~12 μg/mL)绘制标准曲线,得到样品总酚含量回归方程 $y=107.66x+0.0642$ ($R^2=0.996$)。总酚含量表示为每毫克样品中相当的没食子酸质量,以干物质计。

采用硝酸铝比色法^[12]测定样品中总黄酮含量。以芦丁为标准品(0~0.1 mg/mL)绘制标准曲线,得到样品总黄酮含量回归方程 $y=12057x+0.003$ ($R^2=0.9997$)。总黄酮含量表示为每毫克样品中相当的芦丁质量,以干物质计。

采用pH示差法^[13]测定样品中花青素含量。取待测液1 mL,分别用pH 1.0和pH 4.5的缓冲液定容至10 mL,分别测定两种溶液在700 nm和510 nm波长处的吸光度。以矢车菊素-3-葡萄糖苷为标准品,花青素含量表示为每毫克样品相当于矢车菊素-3-葡萄糖苷的质量,以干物质计,按公式(1)计算。

$$\text{花青素含量}/(\text{mg/g}) = \frac{A \times M \times \text{DF} \times V}{\varepsilon \times m} \quad (1)$$

式中: $A = (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}1.0} - (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}4.5}$; M 为矢车菊-3-葡萄糖苷的摩尔质量(449.2 g/mol); DF 为稀释倍数(10); V 为样品提取液总体积/mL; ε 为样品中矢车菊-3-葡萄糖苷的摩尔吸光系数(26900 L/(mol·cm)); m 为样品质量/g。

1.3.4 DPPH自由基清除能力的测定

参照郑时莲^[14]、Moon^[15]等的方法并稍作修改。取1.0 mL样品提取液与3.0 mL DPPH溶液(0.1 mmol/L)

混匀,避光反应30 min后,以无水乙醇为空白对照,于517 nm波长处测定样品的吸光度。根据Trolox对DPPH自由基清除能力的标准曲线,样品的DPPH自由基清除能力以每克样品提取液具有相同抗氧化能力所需Trolox的质量表示。DPPH自由基清除率计算如式(2)所示。

$$\text{DPPH自由基清除率}/\% = \frac{A_1 - (A_{II} - A_{III})}{A_1} \times 100 \quad (2)$$

式中: A_1 为1 mL提取溶剂与3 mL DPPH溶液混合后在517 nm波长处的吸光度; A_{II} 为1 mL样品提取液与3 mL DPPH溶液混合后在517 nm波长处的吸光度; A_{III} 为1 mL样品提取液与3 mL无水乙醇在517 nm波长处的吸光度。

1.3.5 总还原能力的测定

参照Benzie等^[16]的方法并稍作调整。总还原能力(ferric ion reducing antioxidant power, FRAP)测定的溶液现用现配,将15 mL 300 mmol/L pH 3.6的醋酸盐缓冲液、1.5 mL 10 mmol/L TPTZ溶液、1.5 mL 20 mmol/L FeCl_3 溶液混合,用前预热至37 °C。根据不同浓度 FeSO_4 溶液做FRAP标准曲线,样品的FRAP以达到同样吸光度变化(ΔA)所需的 FeSO_4 溶液的物质的量表示。取30 μL样品,加入90 μL双蒸水和0.9 mL FRAP溶液,混匀后在37 °C反应10 min,立即测定593 nm波长处吸光度。每个样品平行测定3次, ΔA 越大说明FRAP越强。

1.3.6 ABTS自由基清除能力的测定

ABTS自由基清除能力参考Re等^[17]的方法并稍作修改。ABTS母液的配制:准确称取0.0384 g ABTS,用双蒸水配制成10 mL浓度为7 mmol/L的溶液,并加入0.176 mL 140 mmol/L过硫酸钾溶液,在37 °C下避光反应12~16 h制得ABTS母液,置于4 °C保存。使用前将其用无水乙醇稀释,使其在732 nm波长处的吸光度为 0.70 ± 0.02 。将0.2 mL样品加到3.5 mL ABTS母液中反应6 min后立即测定吸光度 A_s ,每个样品重复3次。取0.2 mL 70%乙醇溶液与3.5 mL ABTS母液混匀,作为空白对照组,测定其在732 nm波长处的吸光度,记为 A_c 。取0.2 mL待测样品与3.5 mL无水乙醇混匀,相同条件下,测定其吸光度 A_0 ; ABTS自由基清除率计算如式(3)所示。

$$\text{ABTS自由基清除率}/\% = \frac{A_c - (A_s - A_0)}{A_c} \times 100 \quad (3)$$

根据Trolox对ABTS自由基清除率做标准曲线,样品的ABTS自由基清除能力以每克样品提取液具有相同抗氧化能力所需Trolox的质量表示。

1.3.7 活性物质成分分析

称取干燥的正丁醇萃取物,用超纯水配成14 mg/mL溶液,0.45 μm微孔滤膜过滤后用于HPLC-MS/MS分析。

HPLC条件: C_{18} 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 0.5 μm); 流动相B: 乙腈, 流动相A: 体积分数0.1%甲

酸溶液。梯度洗脱条件为：0~4 min，10%流动相B；4~7 min，10%~15%流动相B；7~15 min，15%~35%流动相B；15~17 min，35%~100%流动相B；17~18 min，100%~10%流动相B；流速0.4 mL/min，检测波长308 nm，进样量5 μ L，柱温40 $^{\circ}$ C。

MS条件：采用正离子模式；电喷雾离子源；干燥器温度400 $^{\circ}$ C；离子源温度120 $^{\circ}$ C；干燥气流速10 L/min；喷雾气压力344 kPa；毛细管裂解电压3.5 kV；锥孔电压40 V；扫描范围： m/z 100~1 200。根据各峰的保留时间、分子质量以及特征结构碎片，与文献中的研究结果及标准品对照进行比对鉴定。

1.4 数据统计分析

每组实验重复测定3次，结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用Origin 9.0软件作图，SPSS 22.0软件进行数据分析，Pearson法进行相关性分析，单因素方差分析法进行显著性分析， $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 不同品种木槿花提取液中生物活性物质含量

表1 不同品种木槿花提取液中总酚、总黄酮和花青素含量
Table 1 Contents of polyphenols, flavonoids and anthocyanins extracted from different varieties of hibiscus flowers

品种	总黄酮含量	总酚含量	花青素含量
粉紫重瓣木槿花	8.57 \pm 0.06 ^c	15.55 \pm 0.27 ^d	1.82 \pm 0.06 ^b
薰衣草薄绸木槿花	9.33 \pm 0.10 ^d	14.81 \pm 0.04 ^c	3.31 \pm 0.02 ^e
木槿原种	12.68 \pm 0.06 ^e	17.33 \pm 0.04 ^e	1.10 \pm 0.02 ^a
紫玉	7.36 \pm 0.10 ^b	13.16 \pm 0.03 ^b	2.87 \pm 0.09 ^d
雅致木槿	7.08 \pm 0.06 ^a	12.16 \pm 0.08 ^a	2.03 \pm 0.02 ^c

注：同列肩标小写字母不同表示差异显著（ $P < 0.05$ ）；下同。

由表1可知，不同品种木槿花提取液的总酚、总黄酮和花青素含量具有显著性差异（ $P < 0.05$ ）。5个品种木槿花提取液的总酚含量从高到低依次为木槿原种、粉紫重瓣木槿花、薰衣草薄绸木槿花、紫玉和雅致木槿，总黄酮含量从高到低依次为木槿原种、薰衣草薄绸木槿花、粉紫重瓣木槿花、紫玉和雅致木槿。5个品种木槿花提取液中的总酚含量和总黄酮含量变化趋势基本一致。木槿原种的总酚和总黄酮含量明显高于其他4个品种，分别达到了17.33 mg/g和12.68 mg/g，分别是雅致木槿（总酚和总黄酮含量分别为12.16、7.08 mg/g）的1.4倍和1.8倍。5个品种木槿花提取液的花青素含量与木槿花的颜色深浅一致，颜色越深花青素含量越高^[18]。5个品种中薰衣草薄绸木槿花的颜色最深，花青素含量（3.31 mg/g）最高，木槿原种的颜色最浅，花青素含量只有1.10 mg/g，仅为薰衣草薄绸木槿花的1/3。

2.2 不同品种木槿花提取液抗氧化活性比较

表2 不同品种木槿花提取液抗氧化活性比较
Table 2 Antioxidant activity of hibiscus flower extracts from different varieties

品种	FRAP/ (mmol/g)	DPPH自由基清除 能力/(mg/g)	ABTS自由基清除 能力/(mg/g)
粉紫重瓣木槿花	1.42 \pm 0.05 ^c	6.52 \pm 0.01 ^c	16.99 \pm 0.01 ^c
薰衣草薄绸木槿花	1.54 \pm 0.01 ^b	6.77 \pm 0.03 ^b	17.77 \pm 0.01 ^b
木槿原种	1.58 \pm 0.01 ^a	6.82 \pm 0.01 ^a	17.96 \pm 0.01 ^a
紫玉	1.34 \pm 0.02 ^d	6.51 \pm 0.01 ^c	16.94 \pm 0.01 ^d
雅致木槿	0.86 \pm 0.02 ^e	6.17 \pm 0.01 ^d	13.90 \pm 0.01 ^e

从表2可以看出，5种木槿花提取液的FRAP、DPPH自由基清除能力和ABTS自由基清除能力均存在显著性差异（ $P < 0.05$ ），且3种方法测定的抗氧化活性变化规律具有一致性。5种木槿花提取液抗氧化活性从高到低依次为木槿原种、薰衣草薄绸木槿花、粉紫重瓣木槿花、紫玉和雅致木槿。木槿花的抗氧化活性排序与表1显示的总酚和总黄酮含量变化规律基本相同。此结果与徐颖等^[19]对不同品种苹果籽抗氧化活性的研究和白周亚等^[20]对不同品种豇豆抗氧化活性研究结果一致，即总酚含量和总黄酮含量越高，相应的抗氧化活性越强。

2.3 木槿花生物活性物质含量与其体外抗氧化活性的相关性分析

表3 木槿花生物活性物质含量与其体外抗氧化活性的相关性分析
Table 3 Correlations between bioactive contents and *in vitro* antioxidant activity of hibiscus flower extracts

指标	总黄酮 含量	总酚 含量	花青素 含量	FRAP	DPPH自由基清除 能力	ABTS自由基清除 能力
总黄酮含量	1.000	0.918**	-0.545*	0.700**	0.805**	0.668**
总酚含量		1.000	-0.516*	0.824**	0.820**	0.785**
花青素含量			1.000	0.015	0.001	0.056
FRAP				1.000	0.957**	0.994**
DPPH自由基清除能力					1.000	0.952**
ABTS自由基清除能力						1.000

注：*：显著相关（ $P < 0.05$ ）；**：极显著相关（ $P < 0.01$ ）。

大量研究表明，植物提取液的抗氧化活性与其生物活性物质含量之间存在一定的相关性^[21-22]。FRAP、ABTS自由基清除能力和DPPH自由基清除能力是常用的几种抗氧化活性检测方法。从表3可以看出，FRAP、DPPH自由基清除能力和ABTS自由基清除能力间呈极显著的相关性（ $P < 0.01$ ），说明这3种方法能基本能够一致地反映不同品种木槿花提取液的抗氧化活性。总黄酮含量、总酚含量与FRAP、DPPH自由基清除能力、ABTS自由基清除能力之间存在着极显著的相关性（ $P < 0.01$ ），相关系数（ R^2 ）分别为0.700、0.805、0.668和0.824、0.820、0.785。花青素含量与FRAP、DPPH自由基清除能力、ABTS自由基清除能力间的相关性不显著（ $P > 0.05$ ）。由此表明总黄酮和总酚在木槿花的抗氧化

中起主要作用，而不是花青素。此结论与石雪萍等^[23]将食用辛香料中的主要抗氧化作用归因于黄酮类物质和邵佩兰等^[24]将红枣色素的抗氧化作用归因于多酚和黄酮的结论类似。因此，总黄酮和总酚含量高的木槿原种具有较强的FRAP、DPPH自由基清除能力和ABTS自由基清除能力。

2.4 不同极性溶剂木槿花萃取物抗氧化活性比较

表4 不同极性溶剂木槿花萃取物的抗氧化活性比较
Table 4 Antioxidant activity of fraction extracted with different polar solvents extract from hibiscus flower

萃取物	FRAP/ (mmol/g)	DPPH自由基清除 能力/(mg/g)	ABTS ⁺ ·清除 能力/(mg/g)
水相	1.68±0.02 ^c	10.52±0.01 ^c	21.76±0.52 ^c
正丁醇相	6.16±0.10 ^a	15.50±0.02 ^a	40.71±0.33 ^a
乙酸乙酯相	3.67±0.01 ^b	13.31±0.07 ^b	24.01±1.56 ^b
氯仿相	0.52±0.05 ^e	4.78±0.02 ^e	8.97±0.44 ^e
石油醚相	0.75±0.02 ^d	6.81±0.01 ^d	13.02±0.12 ^d

按照图1的流程，用不同极性溶剂对抗氧化活性最强的木槿原种提取液进行萃取。由表4可知，各溶剂萃取相均具有一定的抗氧化活性，且FRAP、DPPH自由基清除能力和ABTS自由基清除能力检测结果具有一致性，均表明正丁醇萃取相的抗氧化活性最强，分别达到6.16 mmol/g、15.50 mg/g和40.71 mg/g，其次是乙酸乙酯萃取相和水萃取相，最弱的是氯仿萃取相。根据相似相溶原理，石油醚和氯仿极性较小，与多酚和黄酮类化合物的极性差异较大，因此萃取物较少，乙酸乙酯和正丁醇极性较大，萃取物中总酚和黄酮类化合物含量较高，相应的抗氧化活性较强。张东京等^[25]在研究梨的不同极性溶剂萃取物的抗氧化活性时发现高极性溶剂萃取物的抗氧化活性更强，与本研究结果相似。

2.5 活性物质成分分析结果

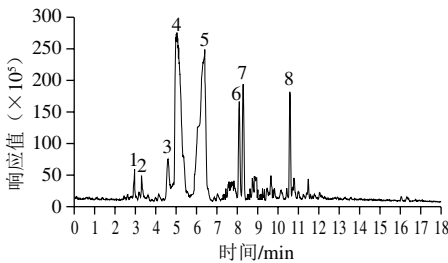


图2 木槿花正丁醇萃取物的总离子流图
Fig. 2 Total ion current chromatogram of the *n*-butanol extract from hibiscus flower

如图2所示，在波长308 nm处各峰基本上得到了分离，主要含有8个色谱峰。

由表5可知，木槿原种正丁醇萃取液中含有8种化合物：山柰酚-*O*-六碳糖-*C*-六碳糖苷、芹菜素、山柰酚-*O*-六碳糖-*C*-六碳糖苷同分异构体、芹菜素-*C*-二糖苷、芹菜素-葡萄糖芹糖苷、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、芹菜素-7-*O*-芸香糖苷、矢车菊素-3-丙二酰葡萄糖苷。

表5 各质谱峰鉴定结果
Table 5 Identification of all mass spectral peaks

峰号	保留 时间/min	[M+H] ⁺ (<i>m/z</i>)	特征离子 碎片 (<i>m/z</i>)	分子式	化合物
1	2.937	611.16	449.11、329.06	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₆	山柰酚- <i>O</i> -六碳糖- <i>C</i> -六碳糖苷
2	3.330	271.05		C ₁₅ H ₁₁ O ₅	芹菜素
3	4.590	611.16	449.11、329.06	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₆	山柰酚- <i>O</i> -六碳糖- <i>C</i> -六碳糖苷同分异构体
4	5.042	595.17	433.00、313.07	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₅	芹菜素- <i>C</i> -二糖苷
5	6.379	565.16	295.00	C ₂₆ H ₂₁ O ₁₄	芹菜素-葡萄糖芹糖苷
6	8.094	595.16	433.11、287.05	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₅	山柰酚-3- <i>O</i> -芸香糖苷
7	8.289	579.17	433.11、313.07	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₄	芹菜素-7- <i>O</i> -芸香糖苷
8	10.576	535.10	287.05	C ₂₄ H ₂₅ O ₁₄	矢车菊素-3-丙二酰葡萄糖苷

1号峰的保留时间为2.937 min，其分子离子峰[M+H]⁺为*m/z* 611.16。在其二级质谱中出现了*m/z* 449.11、413.00、353.07、329.06、299.06的碎片离子；其中*m/z* 449.11的碎片离子峰是分子离子峰*m/z* 611.16失去1分子六碳糖；*m/z* 329.06为[M+H-162-120]⁺，即失去一个六碳糖基；*m/z* 287为[329-CH₂-CO]⁺，即为山柰酚的母环。参照文献[26]推断1号峰可能是山柰酚-*O*-六碳糖-*C*-六碳糖苷。通过与标准品对照，证实为山柰酚-*O*-六碳糖-*C*-六碳糖苷。

2号峰的保留时间为3.330 min，其分子离子峰[M+H]⁺为*m/z* 271.05。参考文献[27]猜测其有可能是芹菜素。通过与标准品对照，证实其为芹菜素。

3号峰的保留时间为4.590 min，其分子离子峰[M+H]⁺为*m/z* 611.16。其二级质谱出现的*m/z* 449.11、413.00、353.07、329.06、299.06的碎片离子峰与1号峰几乎一样，因此推测3号峰可能是1号峰山柰酚-*O*-六碳糖-*C*-六碳糖苷的同分异构体^[26]。

4号峰的保留时间为5.042 min，其分子离子峰[M+H]⁺为*m/z* 595.17。在其二级质谱中产生了*m/z* 433.00、367.07、337.07、313.07、283.05的碎片离子峰，其中*m/z* 433.00为[M+H-162]⁺的碎片离子峰有可能是其分子离子峰丢失了一个六碳糖所致，*m/z* 313.07可能是*m/z* 433.00失去一个以碳苷键连接的六碳糖而产生，依此推断母核离子应为芹菜素*m/z* 271.05即[313-CH₂-CO]⁺，参考文献[26]推测该物质可能是芹菜素-*C*-二糖苷。通过与标准品对照，证实其为芹菜素-*C*-二糖苷。

5号峰的保留时间为6.379 min，其分子离子峰[M+H]⁺为*m/z* 565.16。在二级质谱中碎片离子峰*m/z* 295.00为分子离子峰*m/z* 565.16失去*m/z* 270.16的碎片所得，参照文献[28]推测该碎片离子峰可能是芹菜素，因此推断5号峰可能是芹菜素-葡萄糖芹糖苷。

6号峰的保留时间为8.094 min，其分子离子峰[M+H]⁺为*m/z* 595.16。在其二级质谱中有*m/z* 287.05的碎片离子峰，此峰为山柰酚母环；*m/z* 433.11为分子离子峰*m/z* 595.16失去一个中性片段葡萄糖苷所致，参照文献[29]推测其可能是山柰酚-3-*O*-芸香糖苷。

7号峰的保留时间为8.289 min, 其分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 m/z 579.17。二级质谱中产生了 m/z 433.11、337.07、313.07、283.05的碎片离子峰, m/z 433.11的碎片离子峰有可能是分子离子峰丢失了 m/z 146.06的中性片段鼠李糖苷所得, 而 $[313-CH_2-CO]^+$ 即为芹菜素的母离子 m/z 271.05, 参考文献[26]推测该物质可能为芹菜素-7-*O*-芸香糖苷。

8号峰的保留时间为10.576 min, 其分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 m/z 535.10, 二级质谱中有 m/z 287.05的碎片离子峰, 该碎片离子峰有可能是分子离子峰丢失了 m/z 248.05的丙二酰葡萄糖苷后剩下的矢车菊素的母离子, 参考文献[30]推测该物质可能为矢车菊素-3-丙二酰葡萄糖苷。

以上8种黄酮类化合物是木槿花正丁醇萃取液的主要成分, 因此猜测黄酮类化合物是木槿花抗氧化活性的主要因子。

3 结 论

5种木槿花均含有较多的多酚和黄酮类物质, 具有较强的抗氧化活性。不同木槿花品种的生物活性物质含量与其抗氧化活性之间存在极显著差异($P<0.01$)。5种木槿花提取液抗氧化活性从高到低依次为木槿原种、薰衣草薄绸木槿花、粉紫重瓣木槿花、紫玉和雅致木槿。木槿原种是抗氧化活性最强的品种, 也是目前国内种植最广泛的品种, 这对木槿花的品种选育以及产品开发具有一定的指导意义。

通过相关性分析表明总酚含量、总黄酮含量与FRAP、DPPH自由基清除能力以及ABTS自由基清除能力间呈极显著正相关($P<0.01$)。乙酸乙酯和正丁醇极性较大, 萃取物中多酚和黄酮类化合物较多, 相应的抗氧化活性较高; 石油醚和氯仿极性较小, 与多酚和黄酮类化合物的极性差异较大, 因此萃取出的多酚和黄酮类化合物较少。

通过HPLC-MS/MS对正丁醇萃取液进行综合分析, 初步鉴定出木槿原种花卉提取物正丁醇萃取物中抗氧化物质包括: 山柰酚-*O*-六碳糖-*C*-六碳糖苷、芹菜素、山柰酚-*O*-六碳糖-*C*-六碳糖苷同分异构体、芹菜素-*C*-二糖苷、芹菜素-葡萄糖芹糖苷、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、芹菜素-7-*O*-芸香糖苷、矢车菊素-3-丙二酰葡萄糖苷, 均为黄酮苷类化合物。

参考文献:

[1] 李秀芬, 张建锋, 朱建军, 等. 木槿开花特性及食用价值[J]. 经济林研究, 2014, 32(1): 175-178. DOI:10.3969/j.issn.1003-8981.2014.01.034.
[2] 张文彦, 王晓红, 李安平, 等. 木槿功能性营养成分与生物活性研究进展[J]. 食品与机械, 2017, 33(2): 216-219.
[3] 景立新, 郑丛龙, 林柏全, 等. 木槿花中营养成分研究[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(6): 146-148. DOI:10.3969/j.issn.1005-6521.2009.06.044.

[4] BANDYUKOVA V A, LIGAI L V. Chemical study of the composition of the polyphenolic compounds of *Hibiscus syriacus*[J]. Chemistry of Natural Compounds, 1990, 26(4): 470-471. DOI:10.1007/BF00599016.
[5] 蒋新龙, 蒋益花. 木槿花花叶总黄酮的提取工艺和含量测定[J]. 食品科技, 2007, 32(1): 88-91. DOI:10.3969/j.issn.1005-9989.2007.01.025.
[6] RAKESH P, SUJIT P, JANESHWER Y. Isolation and identification of compounds from the leaves extract of *Hibiscus syriacus* L.[J]. Asian Journal of Pharmacy and Technology, 2015, 5(1): 8-12. DOI:10.5958/2231-5713.2015.00002.1.
[7] CHENG Y L, LEE S C, HARN H J, et al. The extract of *Hibiscus syriacus* inducing apoptosis by activating p53 and AIF in human lung cancer cells[J]. American Journal of Chinese Medicine, 2008, 36(1): 171-184. DOI:10.1142/S0192415X08005680.
[8] HSU R J, HSU Y C, CHEN S P, et al. The triterpenoids of *Hibiscus syriacus* induce apoptosis and inhibit cell migration in breast cancer cells[J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2015, 15(1): 65-73. DOI:10.1186/s12906-015-0592-9.
[9] 张福娣, 游纪萍, 陈新香, 等. 扶桑花色素的抗氧化作用研究[J]. 中国食品学报, 2010, 10(6): 72-76. DOI:10.16429/j.1009-7848.2010.06.033.
[10] 李晓英, 薛梅, 樊汶樵. 蓝莓花、茎、叶酚类物质含量及抗氧化活性比较[J]. 食品科学, 2017, 38(3): 142-147. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201703024.
[11] MARIALEONORALOTISD F, AVV R. Total phenolics and antioxidant capacity of heat-treated peanut skins[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2009, 22(1): 16-24. DOI:10.1016/j.jfca.2008.05.012.
[12] 刘香萍, 王国庆, 李国良, 等. 响应面法优化提取紫花苜蓿叶总黄酮及其抗氧化活性研究[J]. 中国食品学报, 2016, 16(4): 145-152.
[13] 杨兆艳. pH示差法测定桑椹红色素中花青素含量的研究[J]. 食品科技, 2007, 32(4): 201-203. DOI:10.3969/j.issn.1005-9989.2007.04.060.
[14] 郑时莲, 邓泽元, 蒋海伟, 等. 茄子皮中花色苷提取方法的比较及其抗氧化活性研究[J]. 中国食品学报, 2017, 17(1): 92-99.
[15] MOON J K, SHIBAMOTO T. Antioxidant assays for plant and food components[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(5): 1655-1666. DOI:10.1021/jf803537k.
[16] BENZIE I F F, STRAIN J J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay[J]. Analytical Biochemistry, 1996, 239(1): 70-76. DOI:10.1006/abio.1996.0292.
[17] RE R, PELLEGRINI N, PROTEGGENTE A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay[J]. Free Radical Biology and Medicine, 1999, 26(9/10): 1231-1237. DOI:10.1016/S0891-5849(98)00315-3.
[18] 张超, 陈光, 李彦慧. 二乔玉兰开花过程中花色变化的生理生化机制[J]. 西北植物学报, 2012, 32(4): 716-721. DOI:10.3969/j.issn.1000-4025.2012.04.013.
[19] 徐颖, 樊明涛, 冉军舰, 等. 不同品种苹果籽总酚含量与抗氧化相关性研究[J]. 食品科学, 2015, 36(1): 79-83. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201501015.
[20] 白周亚, 阚丽娇, 李昌, 等. 不同豇豆中酚类含量与抗氧化活性[J]. 食品科学, 2017, 38(15): 153-157. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201715025.
[21] 刘禹, 段江莲, 李为琴, 等. 高粱米不同溶剂提取物的抗氧化活性研究[J]. 中国粮油学报, 2013, 28(6): 36-39. DOI:10.3969/j.issn.1003-0174.2013.06.008.
[22] SOCHA R, JUSZCZAK L, PIETRZYK S, et al. Antioxidant activity and phenolic composition of herbhoneys[J]. Food Chemistry, 2009, 113(2): 568-574. DOI:10.1016/j.foodchem.2008.08.029.
[23] 石雪萍, 吴亮亮, 高鹏, 等. 20种食用辛香料抗氧化性及其与黄酮和多酚的相关性研究[J]. 食品科学, 2011, 32(5): 83-86.
[24] 邵佩兰, 徐明, 郭晓丹, 等. 红枣色素中活性成分含量与抗氧化活性的相关性[J]. 食品工业科技, 2016, 37(17): 171-174.
[25] 张东京, 高贵珍, 张兴桃. 不同极性梨多酚抗氧化性能的研究[J]. 食品与机械, 2016, 32(10): 164-167.
[26] 郑梦娇. 扶桑叶黄酮提取纯化及抗氧化活性研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2013: 40-49.
[27] 舒俊生, 黄桂东, 毛健. 滁菊95%乙醇提取液中黄酮类和酚酸类物质的鉴定及分离[J]. 中国食品学报, 2013, 13(4): 207-213.
[28] 孙赓. 撑篙竹(*Bambusa pervariabilis* McClure)竹叶化学成分及其生物活性的研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2010: 153-154.
[29] 陈慧, 盛丹丹, 王文君. 黄金茶醇提取物成分及抗氧化活性的研究[J]. 现代食品科技, 2017, 33(1): 26-32.
[30] 潘瑶, 郑时莲, 邹兴平, 等. 葡萄、芒果、草莓乙醇提取物抗氧化活性组分分析及其抗氧化相互作用[J]. 食品科学, 2017, 38(4): 133-140. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201704022.